



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

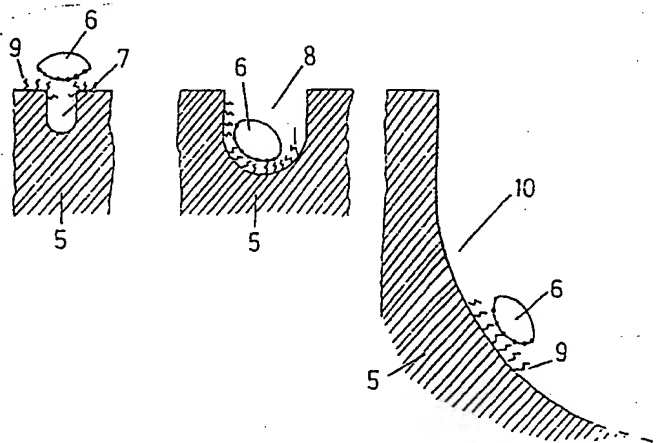
(51) Internationale Patentklassifikation³ : B01D 15/08; B01J 20/30 G01N 31/06	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 83/ 03363 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. Oktober 1983 (13.10.83)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE83/00056 (22) Internationales Anmeldedatum: 25. März 1983 (25.03.83) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 32 11 309.9 (32) Prioritätsdatum: 26. März 1982 (26.03.82) (33) Prioritätsland: DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Mit geänderten Ansprüchen.</i>	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: RIESNER, Detlev [DE/DE]; Eichenwand 15, D-4000 Düsseldorf 12 (DE). COLPAN, Metin [TR/DE]; Christoph-Strasse 67, D-4000 Düsseldorf 1 (DE). (74) Anwälte: HAFT, Uwe usw.; Hans-Sachs-Strasse 5, D-8000 München 5 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.		

(54) Title: CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR ISOLATING MACROMOLECULES

(54) Bezeichnung: CHROMATOGRAPHISCHES VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON MAKROMOLEKÜLEN

(57) Abstract

Various macromolecular compositions may be separated into their various components by means of a chromatographic method. The interactions of the macromolecules with the chromatographic carrier takes place in monodispersed size cavities with chemically modified surface. To solve a separation problem, a carrier material (5) is selected with cavities (7), (8) of which the diameter is correlated with the dimensions of the macromolecules (6) to be isolated and of which the chemical modification allows an optimum non-covalent interaction with the macromolecule. The interaction is further enhanced by attaching the interconnection groups by flexible chain molecules (9) to the carrier material and by excluding bivalent ions from all solvents.



(57) Zusammenfassung

Makromolekulare Gemische beliebiger Zusammensetzung können mit Hilfe eines chromatographischen Verfahrens getrennt und die einzelnen Komponenten isoliert werden. Die Wechselwirkung der Makromoleküle mit dem chromatographischen Träger erfolgt in Hohlräumen möglichst monodisperser Grösse mit chemisch modifizierter Oberfläche. Für ein definiertes Trennproblem wird ein Trägermaterial (5) mit Hohlräumen (7), (8) gewählt, deren Durchmesser in bestimmter Relation zu den Abmessungen der zu trennenden Makromoleküle (6) stehen, und deren chemische Modifizierung eine optimale nicht kovalente Wechselwirkung mit dem Makromolekül erlauben. Gesteigert wird die Wechselwirkung zusätzlich durch die Verankerung der wechselwirkenden Gruppen über flexible Kettenmoleküle (9) zum Trägermaterial und durch den Ausschluss von zweiwertigen Metallionen aus allen Lösungsmitteln.

ATTORNEY DOCKET NUMBER.: 1803-337

SERIAL NUMBER.: 09/756,743

REFERENCE: A117

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	LI	Liechtenstein
AU	Australien	LK	Sri Lanka
BE	Belgien	LU	Luxemburg
BR	Brasilien	MC	Monaco
CF	Zentrale Afrikanische Republik	MG	Madagaskar
CG	Kongo	MR	Mauritanien
CH	Schweiz	MW	Malawi
CM	Kamerun	NL	Niederlande
DE	Deutschland, Bundesrepublik	NO	Norwegen
DK	Dänemark	RO	Rumänien
FI	Finnland	SE	Schweden
FR	Frankreich	SN	Senegal
GA	Gabun	SU	Soviet Union
GB	Vereinigtes Königreich	TD	Tschad
HU	Ungarn	TG	Togo
JP	Japan	US	Vereinigte Staaten von Amerika
KP	Demokratische Volksrepublik Korea		

Chromatografisches Verfahren zur Isolierung von Makromolekülen

Die Erfindung betrifft ein chromatografisches Verfahren, bei dem Hohlräume enthaltende Trägermaterialien und Oberflächenmodifizierung der Trägermaterialien für spezielle Trennprobleme optimiert sind. Der Fortschritt der Biochemie, Molekularbiologie und Polymerforschung und deren Anwendung in Technik, Medizin, Pharmazie und Gentechnologie erfordert die schnelle und systematische Trennung und Isolierung von Makromolekülen. Von besonderem Interesse in den Biowissenschaften sind dabei langkettige Oligonukleotide, hochmolekulare Nukleinsäuren und Proteine. So z. B. tritt in der Gentechnologie häufig das Problem auf, daß aus einem natürlich vorkommenden Gemisch von 100 und mehr verschiedenen hochmolekularen Nukleinsäuren eine einzige molekulare Spezies bis zur Homogenität gereinigt werden muß. Bekanntlich sind die einzelnen Nukleinsäuren durch Molekulargewicht, Größe und Form zu charakterisieren.

Für viele Trennprobleme haben sich chromatografische Verfahren als vorteilhaft erwiesen. Die meisten Vorteile in bezug auf Auflösung, geringen Zeitaufwand und Reproduzierbarkeit bietet dabei die Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC). Diese Methode



-2-

1

wurde bisher in Form der Gelpermeationschromatografie (GPC), der Ionenaustauschchromatographie und der
5 Reversed-Phase Chromatografie (RP-Chromatografie) angewendet. Dabei traten für die hier zu behandelnden Trennprobleme folgende Nachteile auf:

GPC ist nur in der Lage, sehr kleine von sehr großen
10 Molekülen zu trennen.

Bisher bekannte Ionenaustauscher und Reversed-Phase Trägermaterialien konnten mit hoher Auflösung nur für kleine Makromoleküle wie Oligonukleotide, Peptide und Proteinbruchstücke eingesetzt werden. Bei der Trennung von hochmolekularen Makromolekülen wie beispielsweise messenger-Ribonukleinsäuren, Viren, Viroiden, Deoxyribonukleinsäure-Fragmenten und großen Proteinen konnte die erforderliche Auflösung nicht erreicht werden.

20

Das hydrophob-ionische-RPC-5 Chromatografiematerial wie beispielsweise von Larson, J.E. et al. (The Journal of Biological Chemistry (1979) 254, 5535-5541) beschrieben, wurde zwar erfolgreich bei der Trennung von Deoxyribonukleinsäure-Fragmenten eingesetzt, kann jedoch nicht auf die HPLC adaptiert werden, da das Trägermaterial nicht druckstabil ist. Man muß als Nachteile die niedrigen Flußraten, das heißt sehr lange Chromatografiezeiten und eine geringe chromatografische Stabilität des Chromatografiematerials in Kauf nehmen. Aufgrund der chemischen Eigenschaften des RPC-5 Materials war es nicht möglich, komplexe Ribonukleinsäuregemische und Proteingemische aufzutrennen.

35 Mit den bisher bekannten Chromatografieverfahren war es nicht möglich, komplexe makromolekulare Gemische

-3-

1

mit hoher Auflösung und hoher Geschwindigkeit in die einzelnen Molekülspezies zu trennen und zu isolieren oder diese Gemische zu analysieren.

5

Die Erfindung macht es sich zur Aufgabe, ein Verfahren und eine Vorrichtung anzugeben, mit denen die o. a. Nachteile vermieden werden. Insbesondere soll es möglich sein, makromolekulare Gemische der verschiedensten Art, die Komponenten mit sehr unterschiedlichen Abmessungen, beispielsweise im Bereich von 30 Å bis 1000 Å enthalten, in einem einzigen Durchlauf mit sehr hoher Auflösung und bei hoher Durchsatzgeschwindigkeit in ihre Komponenten aufzutrennen. Weiterhin sollten die verwendeten Materialien bei hohem Druck, weiten Temperaturbereichen und mit langer Lebensdauer einsetzbar sein. Wünschenswert ist eine hohe Beladbarkeit mit den zu trennenden makromolekularen Gemischen. Diese Aufgabe wurde gemäß der in Anspruch 1 und den folgenden Ansprüchen beschriebenen Erfindung gelöst. Entgegen der bisherigen Meinung in der Fachliteratur wurde somit ein chromatografisches Verfahren entwickelt und die dazu notwendigen Trägermaterialien synthetisiert, mit denen es möglich ist, komplexe makromolekulare Gemische mit einem sehr weiten Molekülgrößenspektrum mit sehr hohem Auflösungsvermögen aufzutrennen. Dieses Verfahren ist aufgrund seiner Einfachheit und der preiswerten und stabilen Materialien neben der wissenschaftlichen Anwendung vor allem für den industriellen Einsatz geeignet.

35

Entgegen den bisher bekannten Verfahren, die ausschließlich auf chemischen Eigenschaften der Trägermaterialien beruhten, geht die vorliegende Erfindung von der Erkenntnis aus, daß die Größe und/oder Form der Hohlräume der Trägermaterialien von ganz wesent-



1

licher Bedeutung für die Trennung ist, und in bestimmter Relation zur Größe der zu isolierenden Makromolekülspezies stehen muß. Es hat sich gezeigt, daß die Größe der Hohlräume das 1 - 20fache der zu isolierenden Komponente betragen muß. Sollten die Abmessungen der einzelnen zu trennenden Komponenten mehr als den Faktor 20 voneinander verschieden sein, ist es selbstverständlich möglich, die Trennung in mehreren Schritten durchzuführen.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung ist eine geeignete Modifizierung der Oberfläche vorgesehen. Es hat sich dabei als sehr vorteilhaft erwiesen, daß die für die Wechselwirkung mit den zu trennenden Substanzen verantwortlichen Gruppen über flexible Kettenmoleküle auf der Oberfläche verankert sind. Diese Wirkung wird beispielsweise durch Verwendung von γ -Glycidyloxypropyltrimethoxysilan und N,N-Dimethylaminoethanol erreicht. Als wechselwirkende Gruppen kommen stark und schwach basische Anionenaustauscher, stark und schwach saure Kationenaustauscher, Gruppen mit hydrophoben Wechselwirkungen, Gruppen mit Polarisationswechselwirkungen und Gruppen, die mehrere der benannten Eigenschaften kombinieren, in Frage.

Da es sich gezeigt hat, daß bei vielen Anwendungen zweiwertige Metallionen zu erheblichen Störungen Anlaß geben können, wird gemäß der Erfindung weiterhin vorgeschlagen, daß alle mit den Lösungsmitteln in Berührung kommenden Teile aus Edelmetall, Kunststoff oder Glas bestehen, bzw. entsprechende Beschichtungen aufweisen.

35

-5-

1

Die Erfindung ist anhand der Figuren näher erläutert.

5 Es zeigen:

Figur 1 eine an sich bekannte Vorrichtung zur Durchführung eines chromatografischen Verfahrens.

10 Figur 2 Ausschnitte von Querschnitten durch Trägermaterialien mit verschiedenen Hohlraumgrößen.

Figuren

3,4,5

15

Grafische Darstellung verschiedener Elutionsprofile für verschiedene Hohlraumgrößen und Molekülgrößen.

Die in Figur 1 dargestellte Vorrichtung besteht aus einem druckfesten Zylinder (2), der mit einem Zuführungsstutzen (1) und einem Auslaufstutzen (3) versehen ist. Im unteren Teil des Zylinders (2) ist ein sehr feinmaschiges, chemisch inertes Sieb (4) angeordnet. Über dem Sieb (4) befindet sich der aus diskreten makroporösen Silicagelteilchen (5) bestehende chromatografische Träger. Die zu trennenden Substanzen werden in einer Lösung über den Zuführungsstutzen (1) eingefüllt und in den Hohlräumen des Trägers (5) adsorbiert. Bei dem anschließenden Elutionsschritt werden die zu trennenden Substanzen und Moleküle durch ein Lösungsmittel kontinuierlich variierender Zusammensetzung eluiert. Aufgrund der zeitlichen Änderung des Lösungsmittels treten im Ausfluß (3) die getrennten Komponenten zeitlich nacheinander aus.

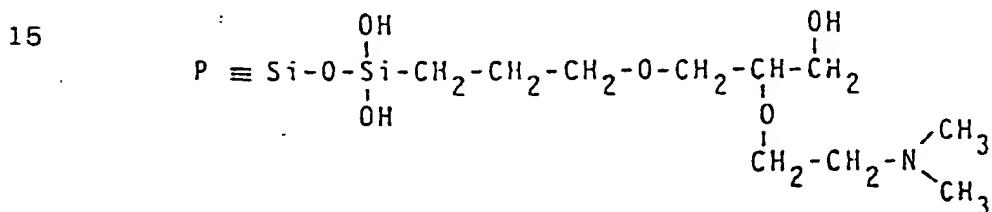
35 Anhand von Figur 2 wird der Einfluß der Hohlraumgröße des Trägermaterials auf die Wechselwirkung mit dem Makromolekül erläutert. Ein Makromolekül (6) kann in



-6-

1

einen zu kleinen Hohlraum (7) des Trägermaterials (5) nicht genügend eindringen, um eine optimale Wechselwirkung einzugehen. Der von seinen Abmessungen günstigere Hohlraum (8) erlaubt dagegen sehr intensive Wechselwirkungen. Um die Wechselwirkung zu erhöhen, sind die wechselwirkenden Gruppen über flexible Kettenmoleküle (9) auf der Hohlraumoberfläche verankert. Ist dagegen der Hohlraum (10) zu groß, so ist wieder mit einer Abnahme der Wechselwirkung zu rechnen. Die Kettenmoleküle haben in diesem Beispiel folgende chemische Struktur:



- 20 Die flexible Kette γ -Glycidyloxypropyltrimethoxysilan ist an der einen Seite am Träger-Silicagel (P) verankert und trägt am anderen Ende die Anionenaustauschergruppe N,N-Dimethylamino.
- 25 Die beschriebene chemische Modifikation wurde auf sphärische Silicagele mit 10 μm Korngröße und Hohlraumgrößen von 100 Å, 500 Å und 4000 Å angewendet. Dazu werden 50 g Silicagelteilchen in einem 1000 ml Dreihalskolben bei einem Druck von <1 mbar 24 h bei einer Temperatur von 240°C aktiviert. Nach dem Abkühlen wurde mit trockenem Stickstoff belüftet und mit 500 ml trockenem γ -Glycidyloxypropyltrimethoxysilan versetzt. Die Umsetzung erfolgte 8 h bei 220 °C unter Stickstoffatmosphäre und unter ständigem Rühren. Nach der Umsetzung wurde das überschüssige γ -Glycidyloxypropyltrimethoxysilan abgesaugt und das Produkt Epoxy-Silica mehrmals mit trockenem Dioxan gewaschen. Das Epoxy-
- 30
- 35

-7-

1

Silica wurde mit einem Vierhalskolben mit Innenthermo-
meter, Rückflußkühler, Rührer und Stickstoffeinlei-
5 tungsrohr mit 500 ml trockenem N,N-Dimethylaminoethanol
versetzt. Die Reaktion wurde durch 1 ml BF_3 /Ether
katalysiert und 24 h unter Rückfluß gekocht. Nach der
Reaktion wurde das Dimethylamino-Silicagel abgesaugt
und mehrmals mit Dioxan, Methanol und Ether gewaschen
10 und bei 50°C getrocknet. Die Ausbeute betrug 51,5 g.

In Figuren 3 bis 5 sind Trennbeispiele von kurzkettigen
Nukleinsäuren (Figur 3) und langkettigen Nukleinsäuren
(Figuren 4, 5) dargestellt. Die Durchmesser der
15 Hohlräume sind - wie in der Zeichnung angegeben -
100 Å, 500 Å und 4000 Å. Die Konzentration der elu-
ierten Komponenten wird durch die UV-Absorption bei
260 nm gemessen und gegen die Zeit aufgetragen.

20 Daraus lassen sich folgende Ergebnisse ablesen. Kurz-
kettige Nukleinsäuren mit einer Länge von 20 Å bis
30 Å werden optimal auf einer Hohlraumgröße von 100 Å
getrennt (Figur 3). Als ein Beispiel für eine Trennung
langkettiger Nukleinsäuren wurde ein natürliches Gemisch
25 von transfer RNA (80 Å Größe), ribosomaler 5SRNA (110 Å
Größe), 9S messenger RNA (300 Å Größe), und Viroid-RNA
(450 Å Größe, eine pflanzenpathogene infektiöse RNA)
gewählt. Es ist in Figur 4 deutlich zu sehen, daß die
größte gewählte Porengröße die beste Trennung ergibt,
30 wobei nicht ausgeschlossen ist, daß mit einer Hohlraum-
größe, die zwischen 500 Å und 4000 Å liegt, eine noch
bessere Trennung zu erzielen wäre. In Figur 5 ist das
Beispiel aus Figur 4 durch langsamere Elution weiter
optimiert worden. Es wird eine vollständige Trennung
35 aller 4 Komponenten erreicht.

-8-

1

Die in den angegebenen Beispielen verwendeten Dimethyl-
amino-Silicagele hatten die Beladbarkeit von 4,8 mg
5 Nukleinsäuregemisch/g (100 Å), 17,2 mg Nukleinsäurege-
misch/g (500 Å) und 5,6 mg Nukleinsäuregemisch/g
(4000 Å).

Das erfindungsgemäß beschriebene Verfahren ist das
10 erste chromatografische Verfahren, das folgende Eigen-
schaften hat:

1. Allgemeine Anwendbarkeit zur Trennung von
15 Makromolekülen.
2. Kurze Chromatografiezeiten und hohe Reprodu-
zierbarkeit der Elutionsprofile durch die
Verwendung von druckstabilen Trägern in HPLC
Apparaturen.
- 20 3. Hohe Beladbarkeit.
4. Chromatografiematerialien mit Langzeitstabi-
lität (kein "Ausbluten" der Chromatografiesäulen)

25

30

35

Patentansprüche

1. Chromatografisches Verfahren zur Isolierung von Makromolekülen unter Verwendung von porenartige Hohlräume enthaltenden Trägern, dadurch gekennzeichnet, daß ein porenähnliche Hohlräume enthaltender Träger verwendet wird, bei dem die Durchmesser der Hohlräume das 1 - 20fache der Abmessungen der zu trennenden Makromoleküle und/oder makromolekularer Aggregate aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Hohlräume auf die größte Abmessung der jeweils zu isolierenden Makromolekülspezies abgestimmt ist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Größe der Hohlräume auf die maximalen Abmessungen der im Gemisch enthaltenden Makromolekülspezies abgestimmt ist.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Hohlraumquerschnitte möglichst konstant sind.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Querschnitte der Hohlräume um einen Faktor 3 größer oder kleiner als der Optimalquerschnitt sein können.



-10-

1

5 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Querschnitt der Hohlräume kreisförmig ist, und die Oberfläche halbkugelförmig ist.

10 7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hohlräume röhrenförmig sind.

15 8. Verfahren nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die die zu trennenden Makromoleküle enthaltende Lösung und die Elutionsmittel, beispielsweise durch Verwendung von Edelmetall, Glas und/oder Kunststoff für Säulen, Röhren, Ventile bzw. Pumpen, frei von zweiwertigen Metallionen gehalten werden.

20 9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Oberfläche der Hohlräume in der Art modifiziert sind, daß nichtkovalente Wechselwirkungen mit den zu trennenden Makromolekülen sichergestellt sind.

30 10. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, gekennzeichnet durch eine stark oder schwach basische anionische Wechselwirkung bewirkende Modifizierung der Oberflächen der Hohlräume.

35 11. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, gekennzeichnet durch eine stark oder schwach saure kationische Wechselwirkung bewirkende Modifizierung der Oberfläche der Hohlräume.

1

12. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, gekennzeichnet durch eine hydrophobe Wechselwirkung bewirkende Modifizierung der Oberflächen der Hohlräume.

5

13. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Polarisationswechselwirkung bewirkende Modifizierung der Oberflächen der Hohlräume.

10

14. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, gekennzeichnet durch eine Kombination der in den Ansprüchen 9 bis 13 genannten Wechselwirkungen.

15

15. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifizierung der Hohlraumflächen durch eine chemische Substanz erfolgt, die die für die Wechselwirkung verantwortlichen Gruppen an flexiblen Kettenmolekülen trägt.

20

16. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der die Hohlräume bildende Träger aus sphärischen oder gebrochenen Materialien mit einer Hohlraumgröße von 100 Å bis 10000 Å und einer spezifischen Oberfläche von 10 m²/g bis 800 m²/g, insbesondere zwischen 500 Å bis 4000 Å, mit einer spezifischen Oberfläche von 5 m²/g bis 200 m²/g und einer möglichst monodispersen Korngröße zwischen 3 µm bis 100 µm beträgt.

30

17. Vorrichtung nach einem oder mehreren der vorher genannten Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die

35

-12-

1 die Hohlräume aufweisenden Träger aus Siliziumdi-
oxyd ob amorph oder kristallin, Alumosilikaten,
Aluminiumoxyden oder aus mit diesen Materialien be-
schichteten Trägersubstanzen bestehen können.

5

18. Vorrichtung zur Herstellung nach den Ansprüchen
9 bis 17, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

10 a) Das Hohlräume enthaltende Trägermaterial wird mit
einem Silanisierungsreagenz der allgemeinen Formel



umgesetzt.

15

R_1 entspricht einem Alkoxyrest mit 1 bis 10
C-Atomen, insbesondere $-OCH_3$, $-OC_2H_5$, oder
 $-OC_3H_7$, oder einem Halogenatom, insbesondere
-Cl, oder einer Dialkylaminogruppe mit identi-
schen oder unterschiedlichen Alkylresten mit 1
bis 6 C-Atomen.

20

R_2 und R_3 entsprechen einem Kohlenwasserstoff-
rest mit 1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-CH_3$,
25 $-C_2H_5$, oder $-C_3H_7$, oder einem Alkoxyrest mit
1 bis 10 C-Atomen, insbesondere $-OCH_3$, OC_2H_5
oder $-OC_3H_7$, oder einem Halogenatom oder einem
durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe
unterbrochenen Alkylrest mit 4 bis 20 C-Atomen,
30 wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach durch
Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino,
Dialkylamino, Hydroxy oder Aryl substituiert
sein kann.

30

35 R_4 entspricht einer Kohlenwasserstoffkette mit
1 bis 20 C-Atomen oder einem durch mindestens

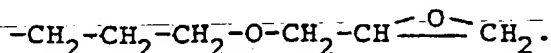
-13-

1

5

eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochenen Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann, insbesondere

10



- b) In einem zweiten Schritt wird der die Hohlräume enthaltende Träger mit einem Reagenz der allgemeinen Formel

15

X-R-Y

II

zum endgültigen Chromatografiematerial umgesetzt. X besteht aus einer Amino-, Hydroxy-, Epoxy-Gruppe oder einem Halogenatom.

20

R besteht aus einer Kohlenwasserstoffkette mit 2 bis 20 C-Atomen oder einem durch mindestens eine Oxa- oder Aminogruppe unterbrochenen Alkylrest, wobei dieser Rest auch ein- oder mehrfach mit Halogen, Cyan, Nitro, Amino, Monoalkylamino, Dialkylamino, Alkoxy, Hydroxy, Aryl und/oder Epoxy substituiert sein kann.

25

30

Y entspricht einem Kohlenwasserstoffrest mit Anionen- oder Kationenaustauscher bildenden funktionellen Gruppen mit 1 bis 10 C-Atomen, der ein- oder mehrfach mit Amino-, Monoalkylamino-, Dialkylamino-, Quartäralkylamino-, Carboxylgruppen, Boronsäure, Alkyl- und Arylsulfonsäure substituiert sein kann.

35

GEÄNDERTE ANSPRÜCHE

[beim Internationalen Büro am 30. August 1983 (30.08.83) eingegangen;
der ursprüngliche Anspruch 1 wird durch den neuen Anspruch 1 ersetzt; dessen text
folgt. Die ursprünglichen Ansprüche 2 bis 18 bleiben unverändert]

1. Chromatografisches Verfahren zur Isolierung und Analyse von Makromolekülen, insbesondere von Nucleinsäuren und Proteinen, unter Verwendung von porenartige Hohlräume enthaltenden Trägern, dadurch gekennzeichnet, daß ein porenähnliche Hohlräume enthaltender Träger verwendet wird, bei dem die Durchmesser der Hohlräume das 1 - 20fache der Abmessungen der zu trennenden Makromoleküle und/oder makromolekularer Aggregate aufweisen, und die Oberflächen der Hohlräume zur physikalischen Wechselwirkung mit den zu trennenden Makromolekülen geeignet sind.

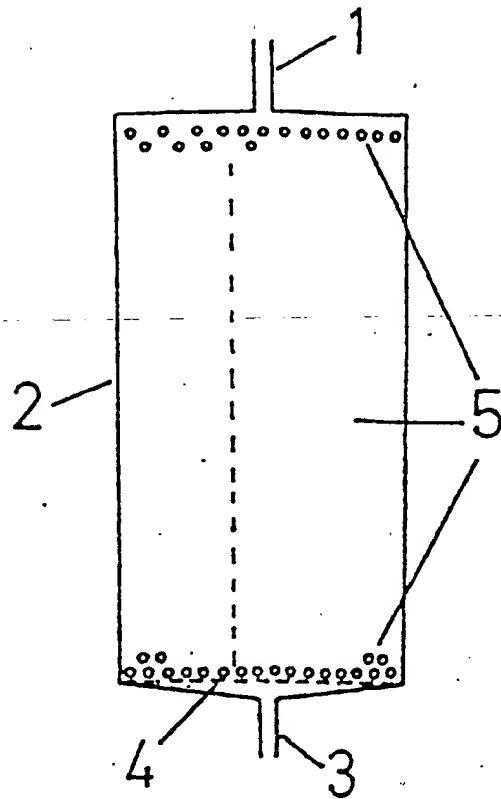


Fig. 1

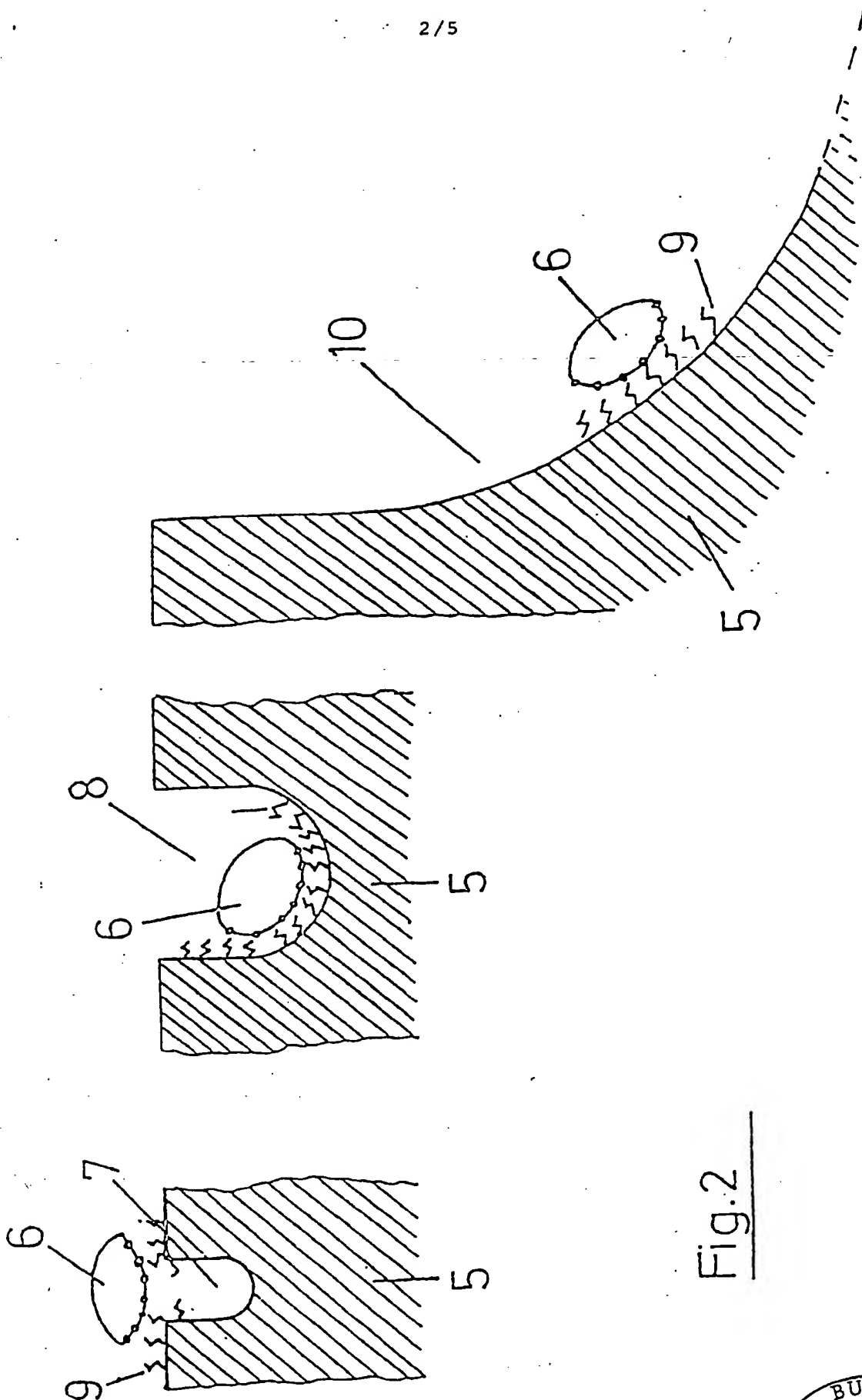


Fig.2

3/5

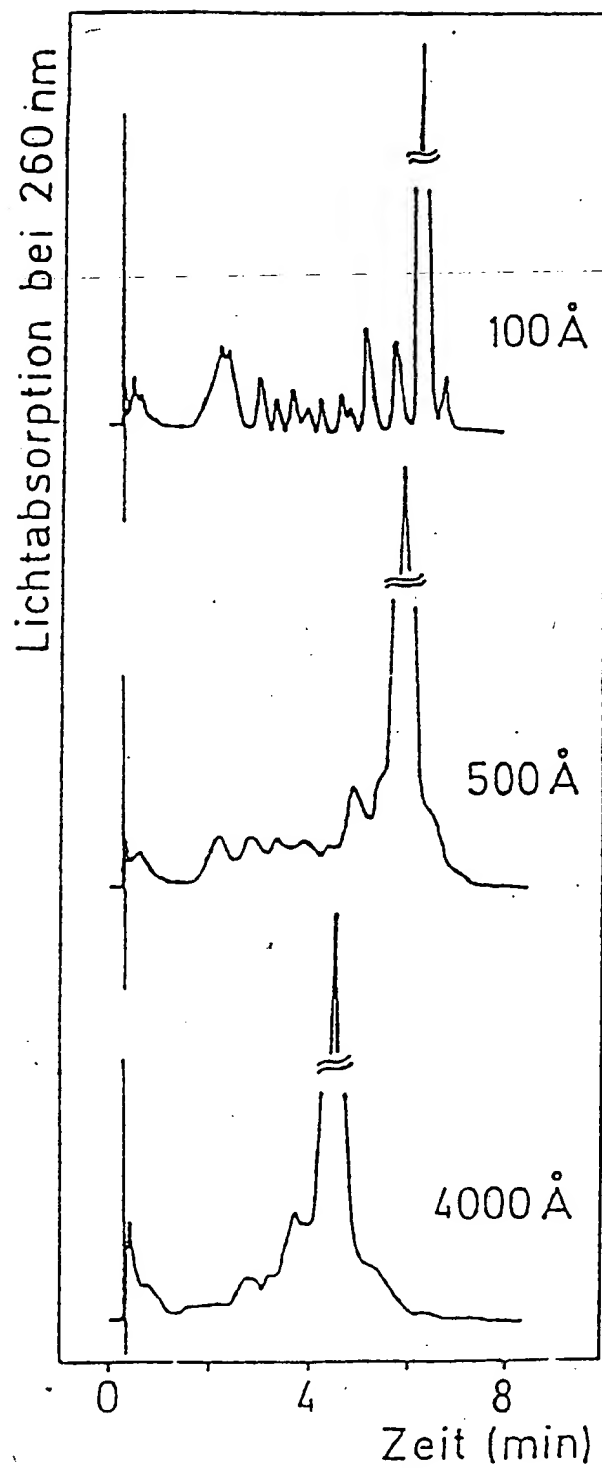
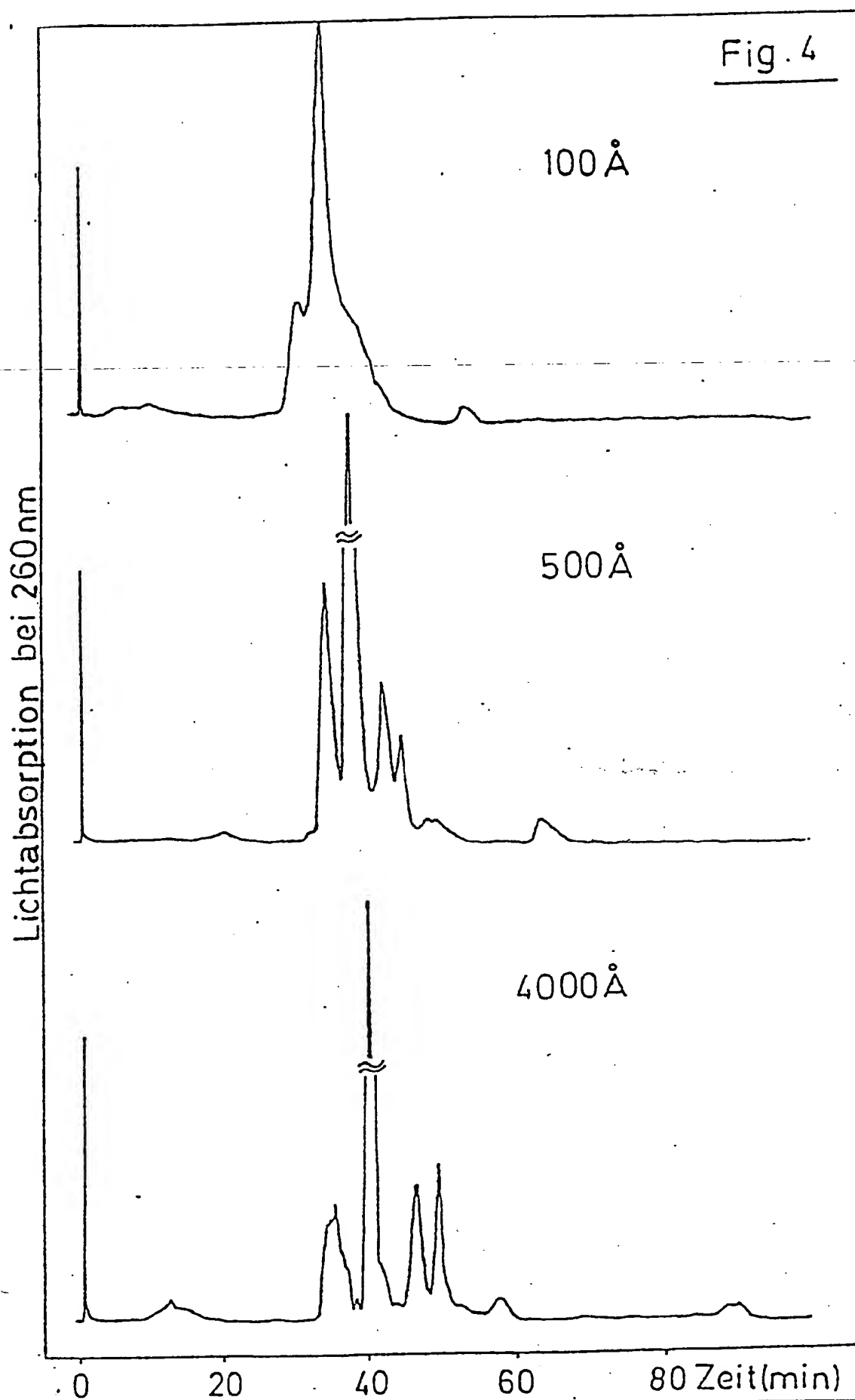
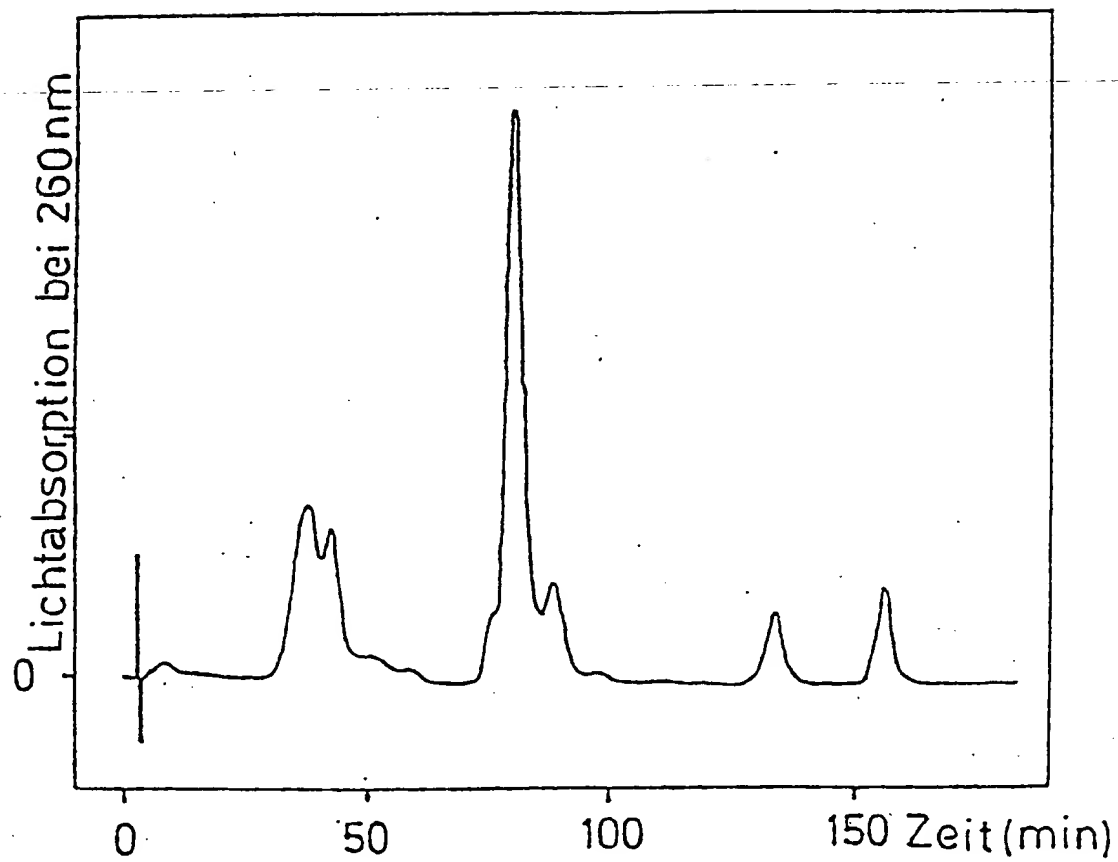


Fig. 3



Fig.5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DE 83/000 56

I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ³		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ³ B 01 D 15/08; B 01 J 20/30; G 01 N 31/06		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁴		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ³	B 01 D; B 01 J	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁵		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ¹⁴		
Category [*]	Citation of Document, ¹⁵ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹⁷	Relevant to Claim No. ¹⁸
X	DE, A, 2601930 (U.K.A.E.A.) 21 July 1977, see page 13, line 12 - page 19, line 22; pages 31-34, examples 9 -10	1,2,9,16,17
Y	US, A, 4029583 (HO CHANG) 14 June 1977, see column 4, line 5 - column 16, line 47	1,9-18
Y	GB, A, 2075362 (KURARA.Y) 18 November 1981; see page 1, lines 42-53, line 62, page 4, example 1; page 7, example 8, page 10, claims 1-25	1-6,9-18
A	US, A, 4118316 (TALLEY) 03 October 1978, see columns 8-12; claims 1-17	1,9,10,16-18
A	US, A, 4140653 (MURA) 20 February 1979, see columns 6-8; claims 1-9	1,9,11
A	FR, A, 2462183 (MERK PATENT) 13 February 1981, see pages 25-26; claims 1-3	1,9,12
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁵</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"Δ" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search ²	Date of Mailing of this International Search Report ²	
17 June 1983 (17.06.83)	15 July 1983 (15.07.83)	
International Searching Authority ¹	Signature of Authorized Officer ²⁰	
European Patent Office		

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/DE 83/00056 (SA 4918)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 12/07/83

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE-A- 2601930	21/07/77	None	
US-A- 4029583	14/06/77	None	
GB-A- 2075362	18/11/81	FR-A- 2480606	23/10/81
		JP-A- 56147710	16/11/81
		DE-A- 3115608	18/03/82
		US-A- 4384954	24/05/83
		JP-A- 56147711	16/11/81
		JP-A- 57056038	03/04/82
		JP-A- 57056039	03/04/82
		JP-A- 57075141	11/05/82
US-A- 4118316	03/10/78	None	
US-A- 4140653	20/02/79	None	
FR-A- 2462183	13/02/81	DE-A- 2930516	12/02/81
		JP-A- 56021643	28/02/81

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 83/00056

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ¹		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl.³ B 01 D 15/08; B 01 J 20/30; G 01 N 31/06		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁴		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. ³	B 01 D; B 01 J	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁵		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN¹⁴		
Art ⁷	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der Maßgeblichen Teile ¹⁷	Betr. Anspruch Nr. ¹⁸
X	DE, A, 2601930 (U.K.A.E.A.) 21. Juli 1977, siehe Seite 13, Zeile 12 - Seite 19, Zeile 22; Seiten 31-34, Beispiele 9-10	1,2,9,16,17
Y	US, A, 4029583 (HO CHANG) 14. Juni 1977, siehe Spalte 4, Zeile 5 - Spalte 16, Zeile 47	1,9-18
Y	GB, A, 2075362 (KURARAY) 18. November 1981, siehe Seite 1, Zeilen 42-53, Zeile 62; Seite 4, Beispiel 1; Seite 7, Beispiel 8, Seite 10, Ansprüche 1-25	1-6,9-18
A	US, A, 4118316 (TALLEY) 3. Oktober 1978, siehe Spalten 8-12; Ansprüche 1-17	1,9,10,16-18
A	US, A, 4140653 (IMURA) 20. Februar 1979, siehe Spalten 6-8; Ansprüche 1-9	1,9,11
./.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>¹⁵ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche ²	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts ²	
17. Juni 1983	15 JUL 1983	
Internationale Recherchenbehörde ³	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten ³	
Europäisches Patentamt	G.L.M. Kruidenberg	

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (FORTSETZUNG VON BLATT 2)		
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung. * soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile **	Betr. Anspruch Nr. **
A	FR, A, 2462183 (MERK PATENT) 13. Februar 1981, siehe Seiten 25-26; Ansprüche 1-3 -----	1,9,12

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE

INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR. PCT/DE 83/00056 (SA 4918)

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben. Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 12/07/83

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE-A- 2601930	21/07/77	Keine	
US-A- 4029583	14/06/77	Keine	
GB-A- 2075362	18/11/81	FR-A- 2480606	23/10/81
		JP-A- 56147710	16/11/81
		DE-A- 3115608	18/03/82
		US-A- 4384954	24/05/83
		JP-A- 56147711	16/11/81
		JP-A- 57056038	03/04/82
		JP-A- 57056039	03/04/82
		JP-A- 57075141	11/05/82
US-A- 4118316	03/10/78	Keine	
US-A- 4140653	20/02/79	Keine	
FR-A- 2462183	13/02/81	DE-A- 2930516	12/02/81
		JP-A- 56021643	28/02/81

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang :
siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr. 12/82